

ref. 33

(11) N° de publication :

(A n'utiliser que pour
le classement et les
commandes de reproduction).

2.209.553

AE

(21) N° d'enregistrement national

72.43780

(A utiliser pour les paiements d'annuités,
les demandes de copies officielles et toutes
autres correspondances avec l'I.N.P.I.)

DEMANDE DE BREVET D'INVENTION

1^{re} PUBLICATION

(22) Date de dépôt 8 décembre 1972, à 15 h 19 mn.
(41) Date de la mise à la disposition du
public de la demande..... B.O.P.I. — «Listes» n. 27 du 5-7-1974.

(51) Classification internationale (Int. Cl.) A 61 k 27/00//C 07 f 9/00.

(71) Déposant : Établissement public dit : AGENCE NATIONALE DE VALORISATION DE LA
RECHERCHE, Tour Aurore, Cedex n. 5, 92080 Paris-Défense et SOCIÉTÉ D'ÉTUDES ET
D'APPLICATIONS BIOLOGIQUES (S.A.B.), résidant en France.

(73) Titulaire : *Idem* (71)

(74) Mandataire :

(54) Dérivés phosphorylés de la choline et de l'homocholine, leur préparation et leurs applications
en thérapeutique.

(72) Invention de : Pierre Eugène Chabrier de Lassauniere, Thanh Thuong Nguyen et Christian
Jean Marie Warolin.

(33) (32) (31) Priorité conventionnelle :

La présente invention concerne de nouveaux dérivés phosphorylés de la choline et de l'homocholine, leur préparation et leurs applications en thérapeutique.

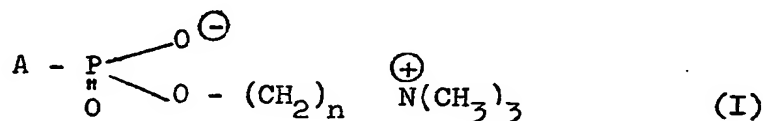
De nombreux esters phosphoriques de la choline d'origine naturelle, par exemple des dérivés de lécithines, sphingomyélines et des esters synthétiques sont déjà connus.

En revanche les esters phosphoriques de l'homocholine sont peu connus.

De plus la préparation des esters phosphoriques de la choline ou de l'homocholine présentait des difficultés.

Les composés de l'invention répondent à la formule suivante :

15

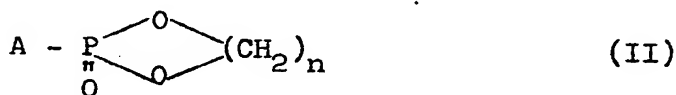


dans laquelle

n est égal à 2 ou 3
 20 et A est choisi dans le groupe constitué par les radicaux morpholino, (p-méthyl-phényl)-1 éthoxy, phényl-1 propoxy et acétamidocarbonyl-2 phénoxy.

Le procédé de l'invention permettant d'obtenir les composés décrits ci-dessus consiste à faire
 25 réagir la triméthylamine $\text{N}(\text{CH}_3)_3$ avec un composé répondant à la formule

30



dans laquelle n et A ont les significations données ci-dessus.

Au cours de la réaction il y a ouverture du cycle de l'oxo-2 dioxaphospholanne-1,3,2 ($n = 2$) ou de l'oxo-2 dioxaphosphorinanne-1,3,2 ($n = 3$).

La réaction est effectuée à une température allant de 70 à 100°C environ, dans un solvant organique tel que l'acétone ou l'acétonitrile.

Les composés de formule II sont obtenus par réaction du chlorure du phosphate d'éthylène ou du chlorure du phosphate de propylène avec le composé correspondant de formule AH. Les composés de formule II dans lesquels n est égal à 3 sont nouveaux.

Les composés de l'invention sont utilisables 5 en thérapeutique en considération de leurs propriétés lipotropes, antistéatosiques, antitoxiques et protectrices de la cellule hépatique et, pour certains d'entre eux également en considération de leurs propriétés cholérétiques.

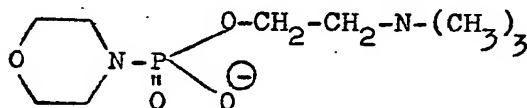
Les exemples suivants illustrent la présente 10 invention.

EXEMPLE 1 :

Morpholino-phosphorylcholine.
(SAB 69 101)

⊕

15



Ce composé est obtenu en deux étapes :

on prépare d'abord le morpholino-2 oxo-2 dioxaphospholanne-1,3,2 que l'on fait réagir ensuite avec la triméthylamine.

20

a) Morpholino-2 oxo-2 dioxaphospholanne-1,3,2

A une solution de 174 parties en poids de morpholine dans 1500 parties de benzène, on ajoute goutte à goutte en agitant et maintenant la température du milieu réactionnel vers 5°C, une solution de 143 parties de chlorure 25 de phosphate d'éthylène (préparé selon la technique de R.S. EDMUNDSON, Chem. and Ind. 1962, 1828) dans 250 parties de benzène.

L'addition terminée en agite une heure à la température ambiante, puis une heure vers 50°C. On filtre 30 le chlorhydrate formé et on le lave avec du benzène. On évapore la solution benzénique et on obtient 155 parties d'un solide blanc.

Rendement : 80 %

F. = 112°C.

b) Morpholino-phosphorylcholine

On introduit dans un flacon à réaction en verre épais pouvant supporter la pression, 19,3 parties en poids de morpholino-2 oxo-2 dioxaphospholanne-1,3,2 et 50 parties en poids d'une solution de triméthylamine à 30 % en poids dans l'acétonitrile.

Le flacon étant fermé hermétiquement, on le chauffe pendant 48 heures vers 70°. On isole le produit formé par filtration, on le lave à l'éther et on le sèche sous vide 10 sur P₂O₅.

On obtient 19 parties de morpholino-phosphorylcholine sous la forme d'un solide blanc, bien cristallisé, très soluble dans l'eau, soluble dans l'éthanol, insoluble dans l'éther, l'acétone....

15

Rendement : 75 %

F. (après recristallisation dans du nitrométhane) 250°C avec décomposition.

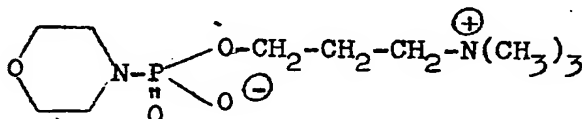
Analyse :

	C	H	N	P
Calculé :	42,8	8,33	11,11	12,3
20 Trouvé :	42,51	8,69	10,94	12,3

EXEMPLE 2 :

Morpholino-phosphorylhomochole (SAB 6979).

25



Ce composé est préparé selon le procédé décrit dans l'exemple 1.

a) Morpholino-2 oxo-2 dioxaphosphorinanne-1,3,2

A une solution de 174 parties en poids de morpholine dans 600 parties de chloroforme rectifié, on ajoute goutte à goutte, en agitant et en maintenant la température du mélange réactionnel vers 5° une solution de 156,5 parties de chloro-2 oxo-2 dioxaphosphorinanne-1,3,2 dans 300 parties de chloroforme.

35

On abandonne la préparation une nuit à la température ambiante, on filtre le chlorhydrate de morpholine et on le lave avec du chloroforme.

On lave la solution chloroformique avec de

l'eau, on la sèche sur du sulfate de sodium ; on filtre et chasse le solvant et on obtient 145 parties d'un solide blanc fondant à 102°C.

Rendement : 70 %.

5

b) Morpholino-phosphorylhomocholine

On opère comme dans l'exemple 1 b) en remplaçant les 19,3 parties en poids de morpholino-2 oxo-2 dioxaphospholanne-1,3,2 par 20,7 parties de morpholino-2 oxo-2 dioxaphosphorinanne-1,3,2 et en chauffant le mélange réactionnel 4 jours vers 100°C, on obtient 25,7 parties d'un solide blanc bien cristallisé.

Rendement : 95 %

F. : 265°C avec décomposition

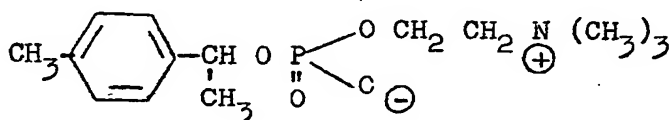
Solubilités : très soluble dans l'eau, le méthanol, l'éthanol, insoluble dans l'éther et l'acétone.

15 EXEMPLE 3 :

Phosphate d'O- γ -(p-méthyl-phényl)-1 éthyle et d'O-(β -triméthylammonio-éthyle) (SAB 69 103)

Ce composé est obtenu en deux étapes selon le procédé de l'exemple 1

20



a) γ -(p-méthyl-phényl)-1 éthoxy-2 oxo-2 dioxaphospholanne-1,3,2

25

A une solution de 14 parties en poids d'hydroxy-1 (p-méthyl-phényl)-1 éthane, de 10,6 parties de triéthylamine et de 150 parties de benzène, on ajoute goutte à goutte, en agitant et en maintenant la température du milieu réactionnel vers 5°C, une solution de 14,3 parties de chlorure de phosphate d'éthylène dans 25 parties de benzène.

30

L'addition terminée, on agite une heure à la température ambiante, puis une heure vers 40°C. On filtre le chlorhydrate de triéthylamine puis on chasse le benzène sous vide, on obtient 19,4 parties d'une huile jaune.

35

Rendement : 80 %.

b) Phosphate d'O-(p-méthyl-phényl)-1 éthyle
et d'O-(β-triméthylammonio-éthyle)
(SAB 69 103)

On fait réagir dans un autoclave pendant
5 48 heures à 70°C une solution de 12,1 parties de phospholanne
3a et de 6 parties de triméthylamine dans 25 parties d'acéto-
nitrile.

On isole le solide formé par filtration,
on le lave à l'acétonitrile et on le sèche sous vide sur P_2O_5 .
10 Le produit peut être purifié par recristallisation dans du
nitrométhane.

Rendement : 75 %

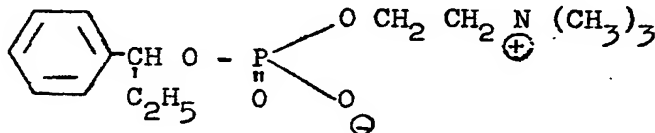
F. : 242°C

Analyse :	C	H	P	N
15 Calculé : %	55,81	7,97	10,29	4,65
Trouvé :	54,23	8,00	10,20	4,51

Solubilités : soluble dans l'eau et les alcools mé-
thylique et éthylique, insoluble dans l'éther et
l'acétone.

EXEMPLE 4 :

20 Phosphate d'O-(phényl-1 propyle) et d'O-(β-
triméthylammonio-éthyle) (SAB 69 104).



25 a) (Phényl-1 propyloxy)-2 oxo-2 dioxaphospho-
lanne-1,3,2.

On opère comme dans l'exemple 3 a) en rempla-
çant l'hydroxy-1 (p-méthyl-phényl)-1 éthane par l'hydroxy-1
phényl-1 propane; on obtient 18,5 parties d'une huile jaunâtre.

Rendement : 75 %

30 b) Phosphate d'O-(phényl-1 propyle) et d'O-(β-
triméthylammonio-éthyle (SAB 69 104)

En faisant réagir 12,1 parties de phospholanne
4 a) avec la triméthylamine comme dans l'exemple 3 b), on
obtient 10,5 parties d'un solide blanc.

35 Très soluble dans l'eau et l'éthanol.

Insoluble dans l'acétone et l'acétonitrile.

Rendement : 70 %

F. : 257 - 258°C.

Analyse :

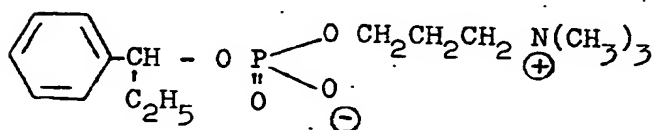
	C	H	N	P
Calculé : %	55,81	7,97	4,65	10,29
Trouvé :	54,06	7,78	4,66	9,82

5

EXEMPLE 5 :

Phosphate d'O-(phényl-1 propyle) et d'O-(γ-triméthylammonio-propyle) (SAB 6974).

10



a) (Phényl-1 propoxy)-2 oxo-2 dioxaphosphorinane-1,3,2.

A une suspension de 2,4 parties d'hydrure de sodium dans 30 parties de tétrahydrofuranne, on ajoute goutte à goutte à 5°C et en agitant 14 parties d'hydroxy-1 phényl-1 propane. L'addition terminée, on agite une heure à la température ambiante puis une heure à 45°C.

On refroidit le mélange réactionnel à 0°, puis on y ajoute ensuite dans les mêmes conditions que précédemment une solution de 15,65 parties de chloro-2 oxo-2 dioxaphosphorinane-1,3,2 dans 20 parties de tétrahydrofuranne.

On filtre le chlorure de sodium formé, on chasse le solvant sous vide puis on reprend le résidu avec du chloroforme. On lave la solution chloroformique avec une solution aqueuse d'hydrogénocarbonate de sodium, puis avec de l'eau. On sèche la solution chloroformique sur Na₂SO₄, on chasse le solvant et on obtient 20 parties d'un résidu blanc visqueux qui cristallise dans le cyclohexane.

Rendement : 78 %

30

F. : <50°C

b) Phosphate d'O-(phényl-1 propyle) et d'O-(γ-triméthylammonio-propyle) (SAB 6974).

En faisant réagir 12,8 parties de phosphorinane 5a avec la triméthylamine comme dans l'exemple 3 b), on obtient 13,4 parties d'un solide blanc qu'on peut purifier par recristallisation dans du nitrométhane.

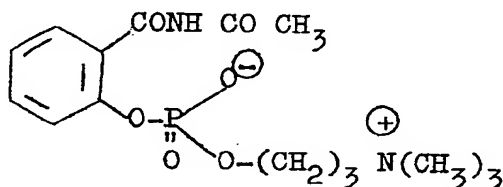
Rendement : 85 %

F : 269 - 270°C.

Analyse :	N %	P %
Calculé :	4,44	9,84
Trouvé :	4,4	9,96

Solubilités : soluble dans l'eau, le méthanol et l'éthanol, insoluble dans l'éther et l'acétone.

- 5 EXEMPLE 6 :
Phosphate d'O-(acétamido-carbonyl-phényle)
et d'O-(γ -triméthylammonio-propyle) (SAB 69 80),



10

- a) (Acétamidocarbonyl-2 phénoxy)-2 oxo-2 dioxaphosphorinanne-1,3,2.

- 15 A une solution de 17,9 parties en poids de N-acétylsalicylamide et de 12 parties de triéthylamine dans 50 parties de diméthyl-formamide, on ajoute lentement à la température ambiante et sous agitation 17 parties de chlorure de phosphate de propylène-1,3.

L'addition terminée, on continue à agiter 1 heure à la température ambiante puis 1 heure à 50°C. On chasse le solvant sous vide puis on reprend le résidu avec du chloroforme. La solution chloroformique est lavée avec de l'eau, séchée et évaporée ; on obtient 25 parties d'un solide amorphe qui se cristallise par grattage dans l'éther de pétrole ($F \approx 130^\circ\text{C}$).

- 25 b) Phosphate d'O-(acétamido-carbonyl-phényle) et d'O-(γ -triméthylammonio-propyle).

On fait réagir dans un autoclave pendant quelques jours à 80°C un mélange de 15 parties du phosphorinanne 6a et de 6 parties de triméthylamine dans 25 parties d'acétonitrile. On isole le produit formé par filtration puis on le purifie par recristallisation dans du nitrométhane. (Rendement 70 %).

$F = 229^\circ\text{C}$

Soluble dans l'eau et l'éthanol. Insoluble dans l'éther et l'acétone.

35 Analyse	C	H	N	P
Calculé % :	50,27	6,4	7,8	8,6
Trouvé :	48,95	6,41	7,78	8,71

Les composés de l'invention ont été soumis à des essais pharmacologiques.

TOXICITE

La toxicité aiguë des composés a été déterminée par voie intraveineuse chez la souris selon la méthode de KARBET et BEHRENS (Arch. Exp. Pathol. Pharm., 177, 1935, p. 379).

5 Les résultats sont indiqués dans le tableau suivant:

T A B L E A U I

Composé (exemple)				DL50 (mg/kg)
10	SAB	69 101	(1)	>5000
	SAB	69 79	(2)	682
	SAB	69 103	(3)	>3000
	SAB	69 104	(4)	>2000
	SAB	69 74	(5)	1337
15	SAB	69 80	(6)	>2000

A titre de comparaison la toxicité du chlorure de choline dans les mêmes conditions est de 42 mg/kg. Les composés de l'invention administrés par voie intraveineuse sont donc moins
20 toxiques que la substance de comparaison.

ACTIVITE ANTISTEATOSIQUE

L'activité lipotropique des différents dérivés de l'invention sur la stéatose expérimentale provoquée par un régime hyperlipidique chez le Rat blanc femelle SPF de race
25 Wistar, d'un poids moyen de 160 g, a été comparée à celle du chlorure de choline.

L'alimentation habituelle des animaux est remplacée par un régime stéatogène pendant toute la durée de l'essai, sauf pour les rats témoins absolus.

30 - Formule du régime stéatogène :

Acide cholique	:	25 g
Cholestérol	:	100 g
Suppocire de Gattefossé	:	5 kg
Aliment U A R pour souris	:	5 kg

35 Les produits sont administrés par sonde gastrique, tous les jours, pendant 8 jours consécutifs à la dose équimoléculaire correspondant à 125 mg de chlorure de choline, et le poids corporel est contrôlé au début et à la fin de l'expérimentation.

40 Les animaux sont sacrifiés après anesthésie au nembutal, et le foie est pesé.

L'évaluation histologique de la stéatose

hépatique est effectuée sur des coupes en congélation à 15µ d'épaisseur, et colorées par l'huile rouge (Oil red O), qui est reconnue comme le colorant histochimique le plus spécifique des lipides.

5	Les valeurs numériques de 0 à 6 ont été attribuées de façon arbitraire aux différents degrés de la surcharge lipidique intracytoplasmique de manière à apprécier l'intensité de la stéatose dans chacune des trois zones du lobule : périlobule, médiolobule et centrolobule.	
10	Valeur numérique arbitraire	Intensité et aspect de la surcharge lipidique
	0	Pas de surcharge
	1	Granulation en petit nombre
	2	Granulation en grand nombre
15	3	Microvacuoles en petit nombre
	4	Microvacuoles en grand nombre
	5	Macrovacuoles
	6	Macrovacuoles remplissant tout le cytoplasme et déformant l'hépatocyte
20		

Dans chaque lot d'animaux on calcule :

1°) - La moyenne de l'intensité stéatosique correspondant aux trois zones lobulaires séparément, pour pouvoir différencier une éventuelle activité antistéatosique, 25 d'ordre topographique.

2°) - La moyenne de l'intensité stéatosique dans les trois zones réunies, pour juger de l'effet antistéatosique global du produit.

3°) - L'activité antistéatosique en pourcentage par rapport à la stéatose observée chez les animaux 30 soumis au régime hyperlipidique seul.

$$\text{Activité antistéatosique} = \frac{\text{Stéatose régime} - \text{stéatose traitée}}{\text{Stéatose régime}} \%$$

35 Les résultats sont donnés dans le tableau suivant.

T A B L E A U II

I A B L E A U II

Composé (ex.)	Dose en mg/kg per os	Poids corporel (g)		Poids du foie (g)		Intensité de la surcharge lipidique				Activité anti- stéatosique (%)
		Début	Fin	Absolu	En % du poids corporel	Zone péri- lobulaire	Zone médul. centrol.	Zone moyenne		
SAB 69101(1)	226	160	164	7,59	4,63	5	2,45	1,3	2,9	17,1
SAB 6979(2)	238	160	150	6,34	4,23	4,1	1,9	1,3	2,4	31,4
SAB 69103(3)	270	160	152	7,18	4,43	4,6	2,1	1,05	2,5	28,5
SAB 69104(4)	270	160	160	7,0	4,37	4,4	2,0	1,0	2,4	31,4
SAB 6974(5)	282	160	158	6,8	4,30	4,3	1,9	1,1	2,4	31,4
SAB 6980(6)	321	160	158	6,97	4,40	4,7	1,75	0,75	2,3	34,2
Chlorure de choline	125	159	159	7,18	4,53	4,5	2,2	1,5	2,7	22,8
Régime seul	-	160	165	7,89	4,77	5,4	3,2	2,05	3,5	-
Témoins	-	159	178	6,76	3,78	-	-	-	-	-

Il ressort de ce tableau que les composés phosphorylés de la choline et de l'homocholine de l'invention ont une activité lipotrope intéressante, supérieure à celle du chlorure de choline, à l'exception du SAB 69 101.

- 5 Le fait qu'ils ne sont pas toxiques leur confère un bon indice thérapeutique qui est très nettement supérieur à celui du chlorure de choline.

2. ACTIVITE CHOLERETIQUE

- 10 Les composés SAB 69 103, 69 104, 6974 et 6980 ont également été étudiés du point de vue cholérétique.

L'activité cholérétique est déterminée chez le Rat mâle SPF de 300 g environ, à jeun depuis 18 heures.

- 15 Les animaux sont anesthésiés au carbamate d'éthyle (900 mg/kg). On introduit un fin catheter dans le canal cholédoque pour permettre l'écoulement de la bile. On en mesure le volume toutes les heures pendant 5 heures. Les animaux sont maintenus dans une pièce à 25° et on utilise 10 animaux par dose. Les produits sont administrés par voie intraduodénale. On détermine également l'extrait sec sur 1 ml.

- 20 Seul le composé SAB 69 103 présente une activité cholérétique notable et significative à partir de la 4ème heure.

Les résultats sont indiqués dans le tableau III ci-dessous :

TABLEAU III

- 25 Les significations des symboles sont les suivants :

H.S. hautement significatif
S significatif
= pratiquement égal aux témoins
↗ augmentation par rapport aux témoins.

	Volume de bile en ml						Extrait sec (1ml) en mg
	Mesure préliminaire	1ère heure	2ème heure	3ème heure	4ème heure	5ème heure	
35	Témoins	0,66	0,65	0,61	0,55	0,42	0,53 26,6
40	Acide déhydrocholique 500 mg/kg	0,70	1,75 ↗ 169 % H.S.	1,57 ↗ 157 % H.S.	1,42 ↗ 158 % H.S.	0,89 ↗ 112 % H.S.	1,07 ↗ 102 % H.S. = 27,7
45	S.A.B. 69 103 500 mg/kg	0,73	0,68 =	0,53 =	0,54 =	0,55 ↗ 31 % S 0,02	0,66 ↗ 24 % S 0,05 = 24,9

Le composé SAB 69 103 se révèle très intéressant car il possède à la fois des propriétés cholérétiques et antistéatosiques tout en n'ayant aucune activité ni sur le système nerveux central, ni sur le système nerveux autonome ni sur le système cardiovasculaire.

Les composés de l'invention, en considération de leurs propriétés, peuvent être utilisés pour le traitement des insuffisances hépatiques, des infections hépatobiliaires, des hépatites chroniques, des cirrhoses, des constipations, stéatoses diverses, etc...

Des exemples de compositions pharmaceutiques sont les suivants :

Granulé

SAB 6979	15 g
sucre aromatisé qsp	100 g

Le granulé peut être présenté en sachet dose contenant

SAB 6979	0,5 g
excipient aromatisé	4,5 g
Comprimé effervescent	
SAB 69 103	0,50 g
excipient qsp 1 comprimé effervescent de 3 g	

La posologie moyenne est de 2 à 4 sachets ou comprimés effervescents par jour, c'est-à-dire de 1 à 2 g de principe actif.

Les composés de l'invention peuvent être associés dans des compositions pharmaceutiques avec des composés modificateurs des sécrétions biliaires, protecteurs de l'hépatocyte, inducteurs enzymatiques, spasmolytiques, etc...

A titre d'exemple l'association suivante est proposée

Solution buvable

SAB 6979

0,50 g

Sorbitol

2 g

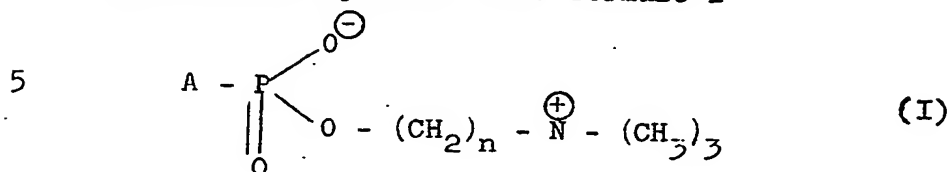
Conservateur et

excipient aromatisé qsp 10 ml

5

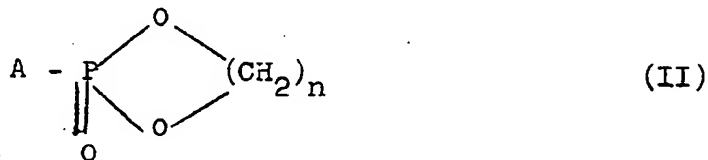
REVENDICATIONS

1.- Dérivés phosphorylés de la choline et de l'homocholine répondant à la formule I



dans laquelle

- n est égal à 2 ou 3
 10 et A est choisi dans le groupe constitué par les radicaux morpholino, (p-méthyl-phényl)-1 éthoxy, phényl-1 propoxy et acétamidocarbonyl-2 phénoxy.
 2.- La morpholino-phosphoryl-choline.
 3.- La morpholino-phosphoryl-homocholine.
 15 4.- Phosphate d'O- γ -(p-méthyl-phényl)-1 éthyle et d'O-(β -triméthylammonio-éthyle).
 5.- Phosphate d'O-(phényl-1 propyle) et d'O-(β -triméthylammonio-éthyle).
 20 6.- Phosphate d'O-(phényl-1 propyle) et d'O-(γ -triméthylammonio-propyle).
 7.- Phosphate d'O-(acétamidocarbonyl-2 phényle) et d'O-(γ -triméthylammonio-propyle).
 8.- Procédé de préparation des dérivés spécifiés dans la revendication 1, procédé caractérisé en ce qu'on fait
 25 réagir la triméthylamine avec un composé répondant à la formule II



30 dans laquelle n et A ont les significations données dans la revendication 1.

9.- Procédé selon la revendication 3, caractérisé en ce qu'on effectue la réaction à une température allant de 70 à 100°C, dans un solvant organique tel que l'acétone ou l'acétonitrile.

10.- Médicament caractérisé en ce qu'il contient comme groupe actif un dérivé tel que spécifié dans l'une quelconque des revendications 1 à 7.

11.- Médicament caractérisé en ce qu'il contient le
5 phosphate d'O $\left[\text{(p-méthyl-phényl)-1 éthy} \right]$ et d'O-(β -triméthyl-ammonio-éthyle).

12.- Composition pharmaceutique contenant un dérivé tel que spécifié dans l'une quelconque des revendications 1 à 7 en association avec une substance ayant la même activité
10 ou une activité complémentaire.